

**REGENERASI TANAMAN DARI JARINGAN
KOTILEDON +RUAS BENIH KEDELAI,
{*Glycine max* L., KULTIVAR WILIS) DENGAN RADIASI SINAR GAMMA**

[Plant Regeneration from Cotyledons of Mature Soybean (*Glycine max* L. Wilis Cultivar
Using Gamma Rays]

Dameria Hutabarat dan Rivaie Ratma

PAIR-BATAN, Jakarta

ABSTRACT

Soybean Wilis cultivar was efficiently regenerated in vitro via somatic embryogenesis. Cotyledonary explants were excised from mature germinating seeds. Seeds were germinated on agar solution and on B5 medium enriched with 5 ppm BA, 0,25 ppm IBA and 500 ppm casein hydrolyzate. Cotyledonary nodes from both germinating seeds were excised and cultured on B5 medium enriched with 5 ppm BA, 0,25 ppm IBA and 500 ppm casein hydrolyzate. Age of seedlings had a remarkable influence on shoot regeneration. Cotyledon from seeds germinated on agar solution with light gave better result in shoot regeneration compare with those germinated in darkness. The highest number of regenerants per explants (5 shoots) was produced by cotyledon from seeds germinated on B5 medium enriched with 5 PPM BA, 0,25 PPM IBA and 500 PPM casein hydrolyzate in darkness. The seeds of soybean were exposed to gamma-rays doses 10 Gy then germinated on S5 medium enriched with 5 PPM BA, 0,25 PPM IBA and 500 ppm casein hydrolyzate did not improve the number of plant regeneration. Only 5-day-old seedlings from seeds were exposed to gamma-rays dose 30 Gy could improve the number of shoot regeneration, one of the cotyledonary node treated produced 21 regeneration shoots.

Kata kunci/keywords: Regenerasi tanaman/plant regeneration, kotiledon/cotyledon, radiasi/radiatin, sinar gamma/gamma rays.

PENDAHULUAN

Sudah banyak penelitian mengenai kultur jaringan kedelai untuk mendapatkan tanaman regenerasi, dan berhasil dengan baik. Kebanyakan para peneliti menggunakan eksplan kotiledon berasal dari biji yang belum masak (Lippmann dan Lippmann, 1984; Barwale *et al.*, 1986; Komatsuda dan Ohyama, 1988; Ghazi *et al.*, 1986; Kurniawan dan Harjosudarno, 1996). Untuk mendapatkan tanaman regenerasi yang siap keluar tabling dengan menggunakan eksplan berasal dari biji yang belum masak, dibutuhkan waktu yang cukup lama. Tanaman regenerasi yang siap keluar tabling adalah tanaman yang sudah berakar dan memiliki dua atau tiga daun-tiga. Barwale *et al.* (1986) membutuhkan waktu paling sedikit 12 bulan dengan 12 hingga 15 subkultur untuk mendapatkan tanaman regenerasi yang siap keluar tabling. Kemampuan membentuk embrio somatik pada kedelai belum masak sangat dipengaruhi oleh faktor genotipe eksplan.

Kurniawan dan Harjosudarno (1996) menguji kemampuan regenerasi lima varietas kedelai, yaitu Krakatau, Ringgit, Lokon, Orba dan Cikuray. Hanya varietas Krakatau yang berhasil membentuk embrio somatik. Varietas Ringgit hanya dapat membentuk kalus dan akar yang sangat banyak dan tiga varietas lainnya hanya menunjukkan adanya pembengkakan pada kotiledon. Lain halnya dengan penggunaan benih kedelai yang dilakukan oleh Fu *et al.* (1996). Sebelas varietas kedelai yang digunakan memberikan tanggapan yang sama dalam kemampuan beregenerasi membentuk embrio somatik.

Untuk mendapatkan biji kedelai yang belum masak dengan umur dan besar polong yang seragam pada waktu yang diinginkan, agak sulit untuk dicapai. Wright *et al.* (1986) dan Fu *et al.* (1996) menggunakan eksplan kotiledon yang berasal dari benih kedelai. Penggunaan benih kedelai sebagai eksplan banyak segi

keuntungannya dilihat dari keseragaman biji dan kemudahan dalam penyediaannya. Fu *et al.* (1996) berhasil mendapatkan tanaman regenerasi hanya dalam waktu enam minggu dan dengan tiga subkultur. Sedangkan Wright *et al.* (1986) membutuhkan waktu 76 hari dan dengan 4 subkultur.

Pada regenerasi tanaman kacang hijau melalui kotiledon dipengaruhi antara lain umur kecambah asal kotiledon dan varietas yang digunakan (Gulati and Jaiwal, 1990; Hutabarat, 1998).

Sinar gamma dapat menyebabkan variasi genetika pada benih yang diradiasi. Dosis mutasi terdapat disekitar LD₅₀. Untuk kedelai dosis mutasi yang umum digunakan antara 150 GY dan 250 GY (Zakri, 1991; Nazim dan El-Hosary, 1991; Bhatnagar dan Tiwari, 1991). Kedelai kultivar Muria merupakan mutan hasil radiasi sinar gamma pada kultivar Orba dengan dosis 400 Gy (Hendratno dan Sumanggono, 1991). Pada penelitian ini digunakan sinar gamma pada benih kedelai dengan dosis rendah yaitu 10 Gy dan 30 Gy dengan harapan dapat menstimulasi terbentuknya tunas. Dosis 15 Gy yang diberikan pada kultur jaringan tunas samping *Stevia rebaudiana* dapat mempertinggi laju pertumbuhan dengan morfologi tetap normal (Toruan *et al.*, 1995).

Makalah yang dikemukakan disini melaporkan hasil pengamatan umur kecambah kedelai yang digunakan dan pengaruh sinar gamma pada regenerasi tanaman dari kotiledon kedelai varietas Wilis.

BAHAN DAN METODE

Benih kedelai varietas Wilis direndam selama satu menit dengan ethanol 95% kemudian direndam selama 5 menit dalam larutan sodium hipoklorit 3% dan dibilas dengan air steril beberapa kali. Sebagian benih yang sudah suci hama direndam dalam air steril pada suhu 10°C selama 4 jam, setelah itu benih dikecambahkan di atas larutan agar 0,7% di dalam botol dan ditutup

dengan plastik tembus cahaya. Sebagian benih yang sudah suci hama dikecambahkan di atas media B5 Gamborg (Gamborg *et al.*, 1968) yang diperkaya dengan BA 5 ppm, IBA 0,25 ppm dan kasein hidrolisat 500 ppm (media B5 +) di tempat gelap. Sebagian benih sebelum disucihamakan diradiasi dengan sinar gamma dosis 10 dan 30 Gy, kemudian dikecambahkan pada media B5 - ditempat gelap. Radiasi benih dilakukan di laboratorium PAIR-BATAN, Jakarta, dengan menggunakan iradiator Gamma Cell-220 dengan aktivitas 209,238 Curri dan laju dosis 161,843 Gy per jam.

Satu, dua, tiga, empat, lima dan tujuh hari setelah benih dikecambahkan, bagian kotiledon diambil dan ditanam pada media B5 yang diperkaya dengan BA 5 ppm, IBA 0,25 ppm dan 500 ppm kasein hidrolisat di dalam cawan petri, pada suhu 25-26°C dengan penyinaran 14 jam sehari.

Pengamatan jumlah tunas yang terjadi dilakukan 28 hari sesudah benih dikecambahkan. Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan menggunakan 7 ulangan pada tiap perlakuan. Setiap unit perlakuan terdiri dari 3 eksplan. Pengujian perbedaan rata-rata menggunakan Duncan's multiple range test pada level 5% (Little dan Jackson, 1978).

HASIL

Eksplan kotiledon yang ditanam pada media B5 +, mulai membesar dua hari sesudah tanam dan dua minggu kemudian mulai terlihat tunas-tunas regenerasi pada bagian buku kotiledon. Pertumbuhan tunas tidak serentak.

Untuk mengetahui umur optimum dari kecambah terhadap regenerasi tunas kotiledon, eksplan diambil dari kecambah umur satu hingga empat hari. Kecambah berasal dari benih yang ditanam di larutan agar dan ditaruh di tempat terang. Pada Tabel 1, terlihat bahwa kecambah umur satu, dua dan empat hari tidak menunjukkan perbedaan yang nyata pada jumlah regenerasi tunas

yang dihasilkan. Kecambah umur tiga hari menghasilkan kotiledon dengan jumlah regenerasi tunas terbanyak, walaupun tidak menunjukkan perbedaan yang nyata bila dibandingkan dengan kotiledon yang berasal dari kecambah umur dua dan empat hari.

Tabel 1. Pengaruh umur kecambah terhadap regenerasi tunas kotiledon kedelai varietas Wilis. Benih dikecambahkan pada larutan agar di tempat terang. Kotiledon ditanam pada media B5 + 5 ppm BAP + 0,25 ppm IBA + 500 ppm kasein hidrolisat.

| Umur kecambah | 1 hari | 2 hari | 3 hari | 4 hari |
|---------------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| Rata-rata jumlah Tunas tiap kotiledon | 2,37 ^{a*} | 3,00 ^{ab} | 3,71 ^b | 2,86 ^{ab} |

* = Nilai yang diikuti oleh huruf yang berbeda, berbeda nyata. (BNT 0,05 = 0,968)

Tabel 2. Pengaruh terang dan gelap pada saat perkecambahan terhadap regenerasi tunas kotiledon kedelai varietas Wilis. Umur kecambah 3 hari, benih dikecambahkan pada larutan agar. Kotiledon ditanam pada media B5 + 5 ppm BAP + 0,25 ppm IBA + 500 ppm kasein hidrolisat.

| Keadaan pada waktu perkecambahan | Rata-rata jumlah tunas tiap kotiledon |
|----------------------------------|---------------------------------------|
| Terang | 3,86 ^{**} |
| Gelap | 0,73 ^b |

* = Nilai yang diikuti oleh huruf yang berbeda, berbeda nyata (BNT 0,05 = 1,22)

Cahaya mempunyai pengaruh dalam jumlah tunas yang dihasilkan kotiledon + ruas. Hal ini terlihat pada Tabel 2. Kotiledon berasal dari kecambah umur tiga hari yang pada waktu perkecambahannya ditempatkan pada dua tempat yang berbeda, yaitu terang dan gelap. Kemudian dikulturkan pada media dan dalam keadaan yang sama, menghasilkan tunas dalam jumlah yang berbeda. Kotiledon yang berasal dari kecambah yang dikecambahkan di tempat terang menghasilkan tunas rata-rata 3,86, jauh lebih banyak bila

dibandingkan dengan kotiledon yang berasal dari kecambah yang dikecambahkan di tempat gelap, yaitu rata-rata 0,73.

Benih kedelai yang dikecambahkan pada media B5+ ditempat gelap menghasilkan kotiledon yang mampu memberikan regenerasi tunas lebih banyak dengan berbeda nyata bila dibandingkan dengan kotiledon berasal dari benih yang dikecambahkan pada larutan agar di tempat terang (Tabel 3). Regenerasi tunas yang dihasilkan oleh kotiledon mempunyai tinggi tunas yang beragam, kurang dari 5 mm hingga di atas 10 mm. Banyak diantaranya yang sudah membentuk daun tiga (Gambar 1A). Regenerasi tunas dengan tinggi > 10 mm apabila dipindahkan ke media basal B5 dalam botol, akan membentuk tanaman lengkap yang siap keluar tabling dalam waktu 3-4 minggu. Untuk regenerasi tunas dengan tinggi < 5 mm dan juga > 5 mm - < 10 mm, perlu dipindahkan ke media basal B5 pada cawan petri. Dibutuhkan waktu kira-kira satu bulan untuk berakar dan cukup tinggi guna dipindahkan ke botol dengan media basal B5 supaya dapat tumbuh lebih besar dan siap keluar tabung. Pada Gambar terlihat bahwa kotiledon berasal dari kecambah yang dikecambahkan pada larutan agar dapat menghasilkan regenerasi tunas. Terjadi penurunan jumlah rata-rata regenerasi tunas tiap kotiledon dari 3,49 pada kecambah umur 3 hari menjadi 1,33 pada kecambah umur 7 hari.

Ada beberapa kotiledon berasal dari kecambah umur 5 hari yang dikecambahkan pada media B5+ menghasilkan satu regenerasi tunas dengan banyak percabangan di bagian atasnya (Gambar ID).

Meskipun benih yang diradiasi dengan dosis 10 tidak menaikkan jumlah rata-rata regenerasi tunas pada kotiledon, ada beberapa kelainan, yaitu adanya satu kotiledon dengan regenerasi akar disamping regenerasi tunas (Gambar IB). Pada kecambah umur 5 hari dari benih yang diradiasi dengan dosis 30 GY, menghasilkan tunas terbanyak dengan berbeda nyata bila dibandingkan dengan kontrol dan yang diradiasi dosis 10 Gy. Sebuah kotiledon yang berasal dari kecambah umur 5 hari

dari benih yang diradiasi dengan sinar gamma dosis 30 Gy menghasilkan 21 regenerasi tunas (Gambar 1C)

PEMBAHASAN

Umur kecambah menentukan jumlah tunas regenerasi yang terbentuk. Umur optimum adalah tiga hari, dan pada umur empat hari terjadi penurunan (Tabel 1) hal ini disebabkan unsur hara yang ada pada kotiledon sebagian sudah berpindah untuk pembentukan akar, batang dan daun.

Kotiledon + ruas yang berasal dari benih yang dikecambahkan di larutan agar pada tempat terang dapat menghasilkan tunas regenerasi yang jauh lebih banyak dibandingkan bila dikecambahkan di tempat gelap. Hasil yang sama juga didapat oleh Thorne *et al.* (1996) pada beberapa kultivar kedelai. Walaupun demikian kotiledon + ruas berasal dari kecambah umur tiga hari yang dikecambahkan pada media B5 + dalam keadaan gelap, dapat menghasilkan tunas regenerasi yang banyak, rata-rata 5 (Tabel 3) dibandingkan bila dikecambahkan pada larutan agar di tempat terang dengan jumlah rata-rata 3,7. Hal ini menunjukkan bahwa terjadi perpindahan unsur hara dan hormon dari media ke kotiledon.

Walaupun cahaya pada waktu perkecambahan benih kedelai mempunyai peranan penting dalam menaikkan jumlah regenerasi tunas yang terbentuk, akan tetapi pada perlakuan transfer gen dengan bantuan *Agrobacterium tumefaciens*, cahaya pada waktu perkecambahan memberi pengaruh negatif. Zhang *et al.* (1997) melakukan penelitian mengenai faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan transfer gen melalui *A. tumefaciens* pada tanaman kekacangan *Phaseolus vulgaris*. Salah satu faktor yang menentukan adalah perkecambahan benih di tempat gelap. Ia mengecambahkan *P. vulgaris* pada media yang diperkaya dengan BA 20 μ M.

Wright *et al.* (1986) mengatakan bahwa hanya kotiledon + ruas yang berasal dari kecambah

yang dikecambahkan pada media yang mengandung BA yang dapat beregenerasi menghasilkan tunas. Ia menggunakan kecambah umur 14 hari dari kedelai kultivar Merrill. Pada Tabel 1 terlihat bahwa kotiledon + ruas berasal dari kecambah umur satu hingga empat hari yang dikecambahkan pada larutan agar dapat menghasilkan tunas. Dengan demikian regenerasi tunas dari kotiledon + ruas kedelai tidak sepenuhnya ditentukan pada terdapatnya BA di media perkecambahan, akan tetapi ditentukan juga oleh faktor umur kecambah.

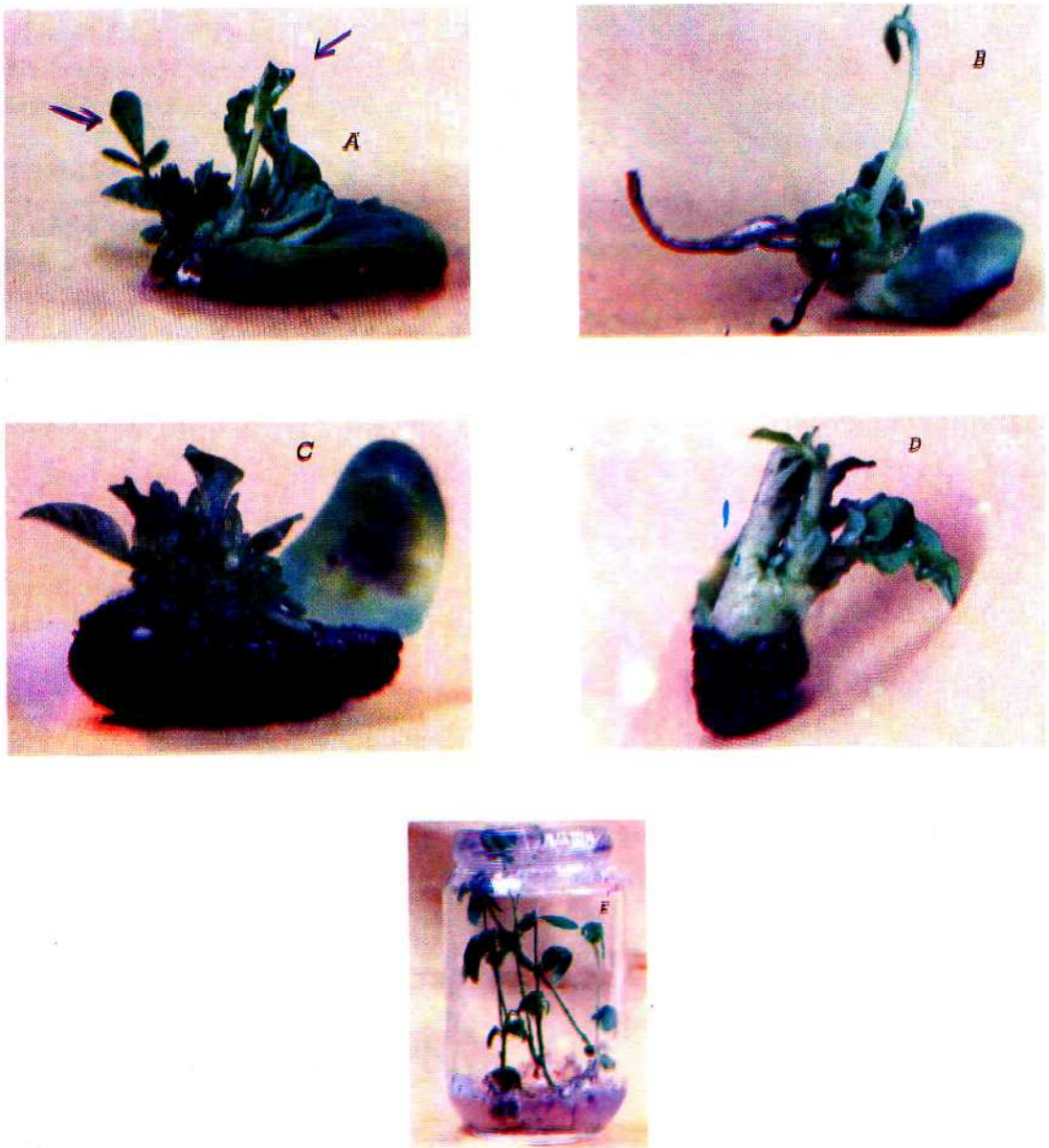
Pengaruh stimulasi yang disebabkan oleh sinar gamma pada benih hanya terlihat pada dosis 30 Gy dari kecambah umur 5 hari. Pada kultur jaringan *Stevia rebaudiana*, pemberian sinar gamma dosis 15 Gy dapat mempertinggi laju pertumbuhan (Toruan *et al.*, 1995). Ini disebabkan karena pada benih penetrasi sinar gamma lebih sulit bila dibandingkan dengan penetrasi pada sistem multiseluler kultur jaringan (Novak).

Sinar gamma dapat menyebabkan mutasi. Mutasi merupakan kejadian uniseluler. Sinar gamma merubah sel secara acak. Karena faktor acak inilah menyebabkan sukarnya untuk mendapatkan mutan yang diharapkan. Rajput *et al.* (1988) meradiasi benih kedelai dengan tujuan untuk mendapatkan mutan dengan hasil panen dan kadar minyak yang tinggi. Pada M₁ diradiasi 1601 benih kedelai dengan dosis sinar gamma 50 GY, 100 Gy, 150 GY dan 200 GY. Pada M₂ didapat 9i galur harapan. Pada M₃ galur harapan yang ada menjadi 16 dan pada M₄ galur harapan yang ada tinggal 4. Lain halnya dengan Zakri (1991), untuk mendapatkan dua galur murni dengan hasil panen tinggi, ia meradiasi 50.000 benih kedelai dengan dosis 150 dan 220 Gy. Dengan demikian, jumlah benih yang diradiasi pada makalah ini; dikemukakan disini kurang banyak, sehingga pada dosis 30 Gy hanya ada satu kotiledon yang terstimulasi dalam pembentukan tunas. menghasilkan 21 tunas.

Tabel 3. Rata-rata jumlah tunas tiap kotiledon kedelai varietas Wills. Umur kecambah 3, 5 dan 7 hari. 0 Gy, 10 Gy, 30 Gy : Benih diradiasi dengan dosis 0 Gy, 10 Gy, dan 30 Gy, dikecambahkan pada media B5 +5 ppm BA + 0,25 ppm IBA + 500 ppm kasein hidrolisat di tempat gelap. Semua kotiledon ditanam pada media yang sama dengan perlakuan yang sama.

| Perlakuan | Rata-rata tunas tiap kotiledon | Persentase tinggi tunas I (%) | | | Tunas dengan darun tiga (%) | Kotiledon berakar (%) |
|-----------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------|-------------|-----------------------------|-----------------------|
| | | < 5 mm | > 5 mm - < 10 mm | >10 mm | | |
| Kecambah 3 hari | | | | | | |
| OGy | 5,06 d | 39,8 | 33,0 | 27,2 | 19,4 | - |
| 10 Gy | 4,14 c | 40,2 | 51,8 | 8,0 | 5,8 | 1.2 |
| 30 Gy | 3,71c | 17,9 | 64,1 | 18,0 | 15,4 | 1.3 |
| Kecambah 5 hari | | | | | | |
| OGy | 3,86 c | 29,6 | 59,3 | 11,1 | 4,9 | - |
| 10 Gy | 3,53 c | 52,7 | 37,8 | 9,5 | 9,5 | - |
| 30 Gy | 4,47 d | 46,8 | 33,0 | 20,2 | 9,6 | 1.1 |
| Kecambah 7 hari | | | | | | |
| OGy | 3,71 c | 80,8 | 15,4 | 3,8 | 1,3 | - |
| 10 Gy | 1,86 a | 51,3 | 46,2 | 2,5 | 2,5 | - |
| 30 Gy | 1,19 a | 68,0 | 24,0 | 8,0 | - | - |

* = Nilai yang diikuti oleh huruf yang berbeda, berbeda nyata. (BNT 0,05 = 0,68)



Gambar 1. Tunas regenerasi pada kotiledon kedelai varietas Wilis.
 Benih kedelai dikecambahkan pada media B5 + BA + EBA + kasein hidrolisat, di tempat gelap. Kotiledon diambil dan ditanam pada media yang sama.
 Keterangan gambar menurut arah jarum jam :

- A. Terdapat 2 buah daun tiga di antara tunas-tunas (tanda panah)
- B. *Jl-egeaexa&i jakar .di sj&xipisg .r^gex>£:vsisj Jjjjaas, JEteuib kejielai dijadiazi dexigJH} jiosis 10 Cy*
- C. 21 tunas pada 1 kotiledon. Benih kedelai diradiasi dengan dosis 30 Gy., dan dari kecambah umur 5 hari.
- D. Satu tunas dengan banyak cabang.
- E. Tanaman regenerasi yang siap keluar tabung.

KESIMPULAN

1. Jaringan kotiledon + ruas kedelai yang diambil dari kecambah yang dikedambahkan pada larutan agar atau pada media B5 + 5 ppm BA + 0,25 ppm IBA + 500 ppm kasein hidrolisat dan ditanam pada media B5 + 5 ppm BA + 0,25 ppm IBA + 500 ppm kasein hidrolisat dapat membentuk regenerasi tunas.
2. Jumlah regenerasi tunas dipengaruhi oleh umur kotiledon.
3. Sinar gamma yang diberikan pada benih dengan dosis 30 Gy dapat menaikkan jumlah tunas regenerasi pada kotiledon yang berasal dari kecambah umur 5 hari.

DAFTAR PUSTAKA

- Barwale UB, Kerns HR, Widholm JM. 1986.** Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis. *Planta* 167,473-481.
- Bhatnagar PS, Tiwari SP. 1991.** Soybean improvement through mutation breeding in India. *Proc. Symp. Plant Mutation Breeding for Crop Improvement* 1, 381-384, Vienna 18-22 June 1990.
- Fu Yu Qing, Lucchin M, Lupotto E. 1996.** Rapid and efficient regeneration from cotyledonary explants of soybean cultivars (*Glycine max* L.). *Plant Breed. Abstr.* 66, 7265.
- Camborg OL, Miller RA, Ojima K. 1968.** Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50, 151-158.
- Ghazi TD, Cheema HV, Nabors MW. 1986.** Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryogenic callus of soybean, *Glycine max* L. *Plant Cell Rep.* 5, 452-456.
- Gulati A, Jaiwal PK. 1990.** Cultures conditions effecting plant regeneration from cotyledons of *Vigna radiata* (L) Wilczek. *Plant Cell TissOrgCult.* 23, 1-7.
- Hendratno K, Sumanggono AMR. 1991.** Improvement in soybean and mungbean using induced mutations. *Proc. Symp. Plant Mutation Breeding for Crop Improvement* 1, 77-84, Vienna 18-22 June 1990.
- Hutabarat Dameria. 1998.** Regenerasi ruas kotiledon pada beberapa varietas kacang hijau (*Vigna radiata* (L) Wilczek). *Prosiding Simposium dan Kongres HI Peripi*, 481-485, Bandung 24-25 September 1997. A.A. Daradjat (Penyunting).
- Komatsuda T, Ohyama K. 1988.** Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant regeration in soybean *Glycine max*. *Theor. Appl. Genet.* 75, 695-700.
- Kurniawan RT, Harjosudarno J. 1996.** Regenerasi kedelai melalui embriogenesis somatik. *J. Bioteknologi Pertanian* 1, 53-59.
- Li BJ, Langridge WHR, Szalay AA. 1985.** Somatic embryogenesis and planlet regeneration in the soybean *Glycine max*. *Plant Cell Rep.* 4,344-347.
- Lippmann B, Lippmann G. 1984.** Induction of somatic embryogenesis cotyledonary tissue of soybean, *Glycine max* L. Merr. *Plant Cell Rep.* 3,215-218.
- Little TM, Jackson HF. 1978.** *Agricultural Experimentation Design and Analysis*, 63. John Wiley & sons, Inc. Toronto.
- Nazim N, El-Hosary AA. 1991.** Promising induced mutations in soybean varieties resistant to leaf spot fungi. *Proc. Symp. Plant Mutation Breeding for Crop Improvement* 2, 227-233, Vienna 18-22 June 1990.
- Novak FJ. 1991.** In vitro mutation system for crop improvement. *Proc. Symp. Plant Mutation Breeding for Crop Improvement* 2, 327-342, Vienna 18-22 June 1990.
- Oh JH, Kwon SH, Song HS, Kim JR. 1988.** Induced mutations for varietal improvement in soybean. *Proc. of a Workshop on Improvement of Grain Legume Production Using Induced Mutations*, 355-370. Washington 1-5 July 1986.

Rajput MA, Siddiqui KA, Sarwar C. 1988.

Induced mutations for yield and oil content in *Glycine max* Merrill. *Proc. Of a Workshop on Improvement of Grain Legume Production Using Induced Mutations*, 435-450. Washington 1-5 July 1986.

Thome GCH, Santarem ER, Ferreira AG. 1996.

Adventitious bud induction and plant regeneration from soybean cotyledonary nodes. *Plant Breed. Abstr.* **66**, 4914.

Toruan- Mathius N, Pratiwi T, Hutabarat T.

1995. Somaclonal variations in *Stevia rebaudiana* Bertoni irradiated with Co-60

gamma rays. *Plant Breed. Abstr.* **67**, 4104.

Wright MS, Kochler SM, Hinchee MA, Carnes

MG. 1986. Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max*. *Plant Cell Rep.* **5**, 150.

Zakri AH. 1991. Breeding high yielding soybean

using induced mutations. *Proc. Symp. Plant: Mutation Breeding for Crop Improvement 2*. 163-169, Vienna 18-22 June 1990.

Zhang Zhan Yuan, Coyne DP, Mitra A. 1991.

Factors affecting *Agrobacterium* mediated transformation of common bean. *Plant Breed. Abstr.* **76**, 10451.